



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 027 434** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) МПК<sup>6</sup> **A 61 K 31/33**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 4474234/14, 16.08.1988

(46) Дата публикации: 27.01.1995

(56) Ссылки: Машковский М.Д. Лекарственные средства. - М., 1987, ч.2, 1с.169-171.

(71) Заявитель:

Научно-исследовательский институт  
трансплантологии и искусственных органов,  
Институт биохимии им.А.Н.Баха РАН

(72) Изобретатель: Шальнев Б.И.,

Сускова В.С., Емец В.И., Пасешниченко  
В.А., Васильева И.С., Воробьев А.С.

(73) Патентообладатель:

Научно-исследовательский институт  
трансплантологии и искусственных органов

**(54) ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ СРЕДСТВО**

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к новому биологически активному препарату олигофуростанозидов из суспензионной культуры диоскорей дельтовидной, и может найти применение для коррекции иммунного ответа. Цель изобретения - новый иммуномодулятор избирательного действия, не обладающий нефротоксическим действием. Указанная цель достигается применением препарата

олигофуростанозидов из суспензионной культуры диоскорей дельтовидной впервые в качестве иммуномодулятора. Избирательность действия этого препарата осуществляется за счет воздействия на структуру и функцию мембран иммунокомпетентных клеток, так как предлагаемый препарат относится к водорастворимым антиоксидантам биогенного типа. 4 табл.

RU 2 027 434 C1

RU 2 027 434 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 027 434** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **A 61 K 31/33**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 4474234/14, 16.08.1988

(46) Date of publication: 27.01.1995

(71) Applicant:  
Nauchno-issledovatel'skij institut  
transplantologii i iskusstvennykh organov,  
Institut biokhimii im.A.N.Bakha RAN

(72) Inventor: Shal'nev B.I.,  
Suskova V.S., Emets V.I., Paseshnichenko  
V.A., Vasil'eva I.S., Vorob'ev A.S.

(73) Proprietor:  
Nauchno-issledovatel'skij institut  
transplantologii i iskusstvennykh organov

(54) **IMMUNOMODULATING DRUG**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, particularly, medicinal  
preparations used for correcting immune  
response. SUBSTANCE: this

oligofurostanoside-based drug is prepared  
from suspension culture of deltoid dioscorea

and employed as immunomodulator. Selective  
effect is produced by disclosed preparation  
on structure and function of membranes of  
immunocompetent cells. Novel drug is classed  
among water-soluble antioxidants of biogenic  
type. EFFECT: no nephrotoxic effect. 4 tbl

RU 2 027 434 C1

RU 2 027 434 C1

Изобретение относится к новому биологически активному препарату олигофуростанозидов из суспензионной культуры клеток диоскореи дельтовидной, который может найти применение в медицине, в частности для коррекции иммунного ответа.

В последние годы важное значение приобрели соединения, оказывающие иммуномодулирующее действие (угнетение или стимуляция клеточного и гуморального иммунного ответа, зависящее от дозы). Большинство из этих соединений относится к природным малотоксичным препаратам. Практическое применение из них получили левамизол, применяющийся главным образом, в иммуностимулирующем режиме, и циклоспорин А, применяющийся как иммуносупрессант. В качестве базового объекта (он же - прототип) взят циклоспорин А - новый тип иммуносупрессанта, действующий только на стадии антиген-чувствительных клеток-предшественников. Циклоспорин А допускает активацию регуляторных механизмов клеток-супрессоров, но ингибирует индукцию хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов. Циклоспорин А наиболее активен при введении во время иммунизации, т.е. он действует на ранней стадии запуска лимфоцитов антигеном и это действие явно отличается от действия азатиоприна или циклофосфамида (1). Недостатком данного препарата является его нефротоксичность при использовании в терапевтических дозах (17-15 мг/кг/день при снижении к концу 1-го месяца до 6 мг/кг/день) (2,3).

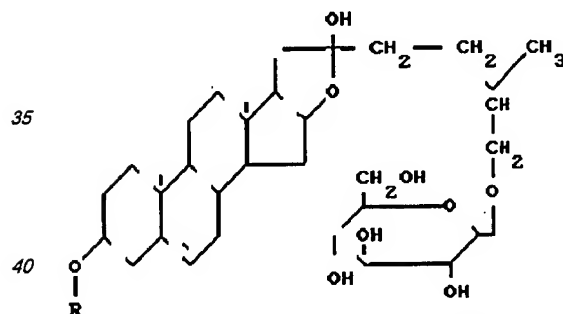
У веществ, относящихся к растительным стероидным гликозидам ряда фуростана, к которым относится заявляемый препарат, иммуномодулирующая активность ранее не была обнаружена. В то же время у них известна: 1) антиоксидантная активность и 2) липотропная активность, выражающая в гипохолестероллитическом действии. Препараты, содержащие в качестве активного начала стероидные гликозиды ряда фуростана - полиспонин и диоспонины, применяются в СССР в течение многих лет в качестве антисклеротических препаратов и представляют собой сумму олигофуростанозидов из корневищ диоскореи кавказской и диоскореи японской, по составу мало отличающихся от заявляемого препарата олигофуростанозидов из суспензионной культуры клеток диоскореи дельтовидной.

Цель изобретения - новый иммуномодулятор избирательного действия, не обладающий нефротоксическим действием.

Указанная цель достигается применением препарата олигофуростанозидов из суспензионной культуры клеток диоскореи дельтовидной впервые в качестве иммуномодулятора, что соответствует критериям "новизна" и "существенные отличия". Избирательность действия этого препарата осуществляется за счет возведения на структуру и функцию мембран иммунокомпетентных клеток, так как предлагаемый препарат относится к водорастворимым антиоксидантам биогенного типа. Его получают известным

способом (5).

Пример 1. Получение препарата олигофуростанозидов. Препарат получают из суспензионной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Well (диоскореи дельтовидной), штамм ИФР ДМ-0,5, которую получили в Институте физиологии растений АН СССР. Биомассу для препаративного выделения препарата отбирали в стационарную фазу роста. Препарат олигофуростанозидов выделяли из этой биомассы путем осаждения с белками. Для этого клеточную массу после отделения от культуральной жидкости экстрагируют водой в соотношении 1:(10-20) в течение 2-3 ч. Осадок отделяют центрифугированием, экстракцию повторяют. К объединенной надосадочной жидкости добавляют сульфат аммония до полного насыщения и выдерживают 30 мин. При этом вместе с белками происходит соосаждение низкомолекулярных гликозидов. Полученный осадок обрабатывают 5-6 раз 96% этанолом, осадок отделяют, промывают этанолом. Надосадочную жидкость упаривают в ротационном испарителе. В осадке получают препарат олигофуростанозидов, который состоит из двух гликозидов: 1) протодиосцина (26-0-β-D-глюкопиранозил-22-окси-фурост-5-ен-3β, 26-диол 3-0-β-чакотриозид) и 2) дельтозида (26-0-β-D-глюкопиранозил-22-окси-фурост-5-ен-3β, 26-диол 3-0-β-дельтотриозид). Общая формула препарата



где R для 1) равно 1 молекуле глюкозы и 2 молекулам рамнозы и для 2) R равно 2 молекулам глюкозы и 1 молекуле рамнозы.

Количественный анализ выделенного препарата проводили с помощью спектрометрического метода, основанного на цветной реакции олигофуростанозидов с реактивом Эрлиха - 1%-ный раствор п-диметиламинобензальдегида в смеси метанол: соляная кислота (концентрированная 66:34г). Чистота полученного препарат 80%. Методом жидкостной хроматографии с 25%-ным ацетонитрилом в качестве подвижной фазы с детектированием при 207 нм в составе препарата нашли следующее соотношение между дельтозидом и протодиосцином 10:16. Препарат представляет собой белый, аморфный порошок, растворимый в воде. Стабилен при хранении при +20°C в закрытой склянке.

Иммуномодулирующий эффект препарата и избирательное действие на иммунокомпетентные клетки и иммунорегуляторные их субпопуляции изучены в тестах in vitro (примеры 2-4). Предварительно было изучено

цитотоксическое действие препарата на лимфоциты периферической крови человека при культивировании их в течение 72 ч в присутствии препарата в концентрациях от 0,1 до 100 мкг/мл. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью трипанового синего. Процент живых клеток составлял 85-90%, что соответствовало контрольным (без препарата) культурам, 10-15% составляла естественная гибель клеток. Таким образом, было показано, что испытуемый препарат в исследованных концентрациях не токсичен.

**П р и м е р 2.** Влияние препарата олигофуростанозидов на Т-хелперы изучено в реакции бласттрансформации лимфоцитов, индуцированных ФГА. При этом мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из геларинизированной крови дифференциальным центрифугированием на градиенте плотности фиколл-гипака ( $\rho=1.077$ ) по Bouum. При постановке реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) лимфоциты в количестве  $0,25-0,50 \times 10^6$  инкубировали в 1 мл среды 199, содержащей 10% сыворотки АВ (IV) группы и 5 мкг ФГА-Р (фирмы "Serva"). В момент постановки культуры до ФГА в опытные пробирки вносили испытуемый препарат в концентрациях от 0,01 до 100 мкг/мл. Пролиферативный ответ лимфоцитов оценивали через 72 ч, причем за 4 ч до окончания культивирования клеток в культуру вносили  $^3\text{H}$ -тимидин в концентрации 0,04 МБК (1 мккюри) на 1 мл культуры. Через 72 ч от начала культивирования каждую пробу переносили на миллипоровые фильтры, отмывали холодным 10%-ным раствором ТХУ и физраствором. Радиоактивность подсчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Результаты выражали в индексе стимуляции, который высчитывали по формуле

$$\text{ИС} = \frac{\text{имп/мин опытных культур}}{\text{имп/мин контрольных культур}}$$

Результаты представлены в табл.1.

Как видно, действие препарата зависело от концентрации, вызывая либо стимуляцию, либо супрессию пролиферативного ответа лимфоцитов на митогенный стимул ФГА. Наибольший стимулирующий эффект препарата олигофуростанозидов выражен в концентрации от 0,01 до 0,10 мкг/мл (в 1,5 раза эффект выше по сравнению с контролем). Препарат в концентрации от 1,0 до 100 мкг/мл оказывал ингибирующий эффект на пролиферативный эффект лимфоцитов, индуцированный ФГА, вплоть до полного исчезновения ответа. Циклоспорин А, взятый в качестве тест-препарата, с выраженным иммуносупрессивным действием, в аналогичных концентрациях ингибировал функцию Т-лимфоцитов в тесте РБТЛ.

Как было показано, РБТЛ, индуцированная ФГА, является моделью активации Т-хелперов. Таким образом, исследованный препарат оказывал зависимый от дозы иммуномодулирующий (стимулирующий или ингибирующий) эффект на активность Т-хелперов в тесте бласттрансформации, индуцированной ФГА.

**П р и м е р 3.** Влияние препарата олигофуростанозидов на активность естественных клеток-киллеров (ЕКК) оценивали, используя в качестве мишеней

перевиваемую миелоидную линию K562 человека, которая по многочисленным работам определяется как высоко чувствительная мишень в цитотоксическом тесте. Клетки, тестируемые на активность спонтанных киллеров, получены от здоровых доноров. Перевиваемые линии K562 и постановку цитотоксического теста осуществляли по методу Зарецкой Ю.М. Данные экспериментов представлены в табл.2.

Как видно из табл.2, спонтанный лизис (выход  $\text{C}^{51}$ ) в среднем составлял 31%. Уровень активности спонтанных киллеров в контроле без препарата составлял  $55 \pm 4\%$ . На клетки-мишени исследуемый препарат не оказывал токсического эффекта. Лизис клеток K562, обработанных разными дозами препарата, не превышал уровня спонтанного лизиса этих клеток. Средний показатель активности ЕКК после обработки их препаратом олигофуростанозидов в дозе от 0,1 до 10,0 мкг/мл не отличался от контроля.

Таким образом, исследованный препарат в диапазоне доз от 0,1 до 10,0 мкг/мл не оказывал влияния на активность естественных (спонтанных) клеток-киллеров, также как и контрольный препарат - циклоспорин А.

**П р и м е р 4.** Проводилась также оценка влияния препарата олигофуростанозидов на генерацию и активность Кон-А-Т-супрессоров. Активацию клеток-супрессоров проводили по методу Shou L с соавт. Лимфоциты донора инкубировали в 1 мл среды RPMI 1640 в отсутствии (контроль 1 - спонтанные супрессоры) или в присутствии 60 мкг/мл КЛн-А (контроль 2 - индуцированные Т-супрессоры) в течение 48 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Затем клетки обрабатывали митомином С, чтобы ингибировать синтез ДНК, и трижды отмывали средой RPMI 1640. К  $0,5 \times 10^6$  клеток, проинкубированных с Кон-А (или без него), добавляли  $0,5 \times 10^6$  аллогенных лимфоцитов и 5 мкг/мл ФГА фирмы "Serva" (тест-систему). Клетки инкубировали 72 ч, за 4 ч до конца культивирования добавляли  $^3\text{H}$ -тимидин. Результаты рассчитывали по формуле:

$$\left(1 - \frac{P}{K}\right) \times 100\% \text{ где } P - \text{число имп/мин в}$$

опытных культурах с Кон-А, К-то же в культурах без Кон-А. Испытуемый препарат добавляли в инкубационные среды с Кон-А в концентрациях 0,1, 1,0, 10,0, 100,0 мкг/мл и инкубировали 48 ч при  $37^\circ\text{C}$  - для оценки влияния их на генерацию Кон-А индуцированных Т-супрессоров. Все эксперименты проводили дважды по 3-5 параллелей в каждом опыте. Данные представлены в табл.3.

Как видно из табл.3, уровень бласттрансформации тест-клеток при добавлении к ним лимфоцитов, инкубированных 48 ч при  $37^\circ\text{C}$  без Кон-А (контроль 1), за счет индукции спонтанных Т-супрессоров, составил 80% уровня бласттрансформации клеток, стимулированных ФГА, который принят за 100% (контроль). Внесение в тест-систему клеток, инкубированных с Кон-А, приводило к снижению уровня бласттрансформации до 20% от контроля за счет ингибирующего действия индуцированных

Кон-А-Т-супрессоров (контроль 2). Культивирование лимфоцитов в присутствии препарата олигофуростанозидов и Кон-А в течение 48 ч при 37°C и внесение их после отмывки в тест-систему угнетало бласттрансформацию тест-клеток практически до спонтанного уровня (5-10%). Это может быть следствием увеличения количества индуцированных Кон-А-Т-супрессоров за счет стимулирующего влияния исследуемого препарата на их генерацию. Циклоспорин А в дозах от 0,1 до 10,0 мкг/мл не оказывал влияния на Т-супрессоры (% бласттрансформации остается на уровне контроля 2), доза 100,0 мкг/мл является для циклоспорина А цитотоксической, поэтому % бласттрансформации снижен до 10%.

Были также проведены эксперименты по изучению влияния предлагаемого препарата по сравнению с известным иммуномодулятором левамизолом на формирование гиперчувствительности замедленного типа у мышей после иммунизации их эритроцитами барана (пример 5). Влияние препарата олигофуростанозидов на формирование ГЗТ у мышей.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) является типичной моделью клеточно-опосредованных иммунных реакций ин vivo, которые играют центральную роль в отторжении аллотрансплантата, резистентности к злокачественным опухолям и инфекции.

Воздействуя препаратом до или после сенсibilизации антигеном и оценивая степень проявления РГЗТ, определяли не только на какую из фаз иммунного ответа - индуктивную (до антигенного стимула) или продуктивную (после антигена), в большей степени оказывает действие препарат, но и оценивали чувствительность к нему различных субпопуляций Т-лимфоцитов, вовлеченных в РГЗТ. В качестве сенсibilизирующего антигена использовали эритроциты барана (ЭБ) у мышей. РГЗТ и ЭБ оценивали по разнице веса контрольной и опытной (после введения разрешающей дозы антигена) лапок.

Изучение влияния нового препарата олигофуростанозидов на формирование реакции ГЗТ у мышей к ЭБ проводили при введении препарата по схемам: за 2 дня до иммунизации, за 1 день до иммунизации и в день иммунизации (-2,-1,0 дни) (влияние на пре-Т-супрессоры) и по схеме: в день иммунизации и на 1 и 2 сут после иммунизации (0,+1,+2 дни) (влияние на Т<sub>гзт</sub>-эффекторы). Данные представлены в табл.4.

Дозы препаратов выбирались

пропорционально терапевтическим дозам препаратов (для препарата олигофуростанозидов учитывалась терапевтическая доза для полиспонина).

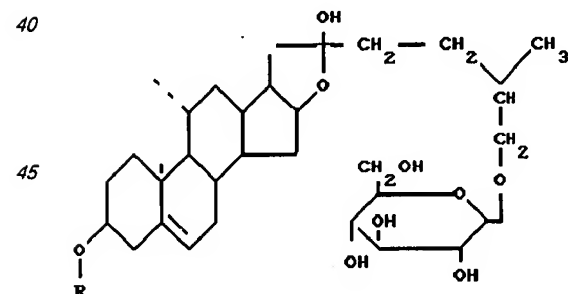
Результаты эксперимента показали, что в исследованных дозах препарат олигофуростанозидов оказывает преимущественное влияние на зрелые Т<sub>гзт</sub>-эффекторы (при введении препарата по второй схеме). Эффект статистически достоверен. Циклоспорин А - прототип - не оказывает влияния на Т<sub>гзт</sub>-эффекторы (другой механизм действия). Левамизол - аналог - оказывает действие как на пре-Т-супрессоры, так и на зрелые Т<sub>гзт</sub>-эффекторы при обеих схемах введения, 6-меркаптопурин (контроль к левамизолу) не оказывает влияния ни на клетки-предшественники (при введении по 1 схеме ни на Т<sub>гзт</sub>-эффекторы (при введении по второй схеме). Полученные результаты показывают, что по механизму действия заявляемый препарат отличается от механизма действия циклоспорина А (прототип). Наиболее вероятно, что его действие в используемой дозе связано со стимуляцией Т-супрессорной активности.

Таким образом, в трех тестах клеточного иммунитета ин vitro и в тесте РГЗТ ин vivo показано иммуномодулирующее действие препарата олигофуростанозидов, выделенного из суспензионной культуры клеток диоскореи дельтовидной, относящегося к классу стероидных гликозидов и обладающих антиоксидантным действием, зависящее от дозы и схемы введения относительно антигенного стимула.

#### Формула изобретения:

#### ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ СРЕДСТВО.

Применение препарата олигофуростанозидов из суспензионной культуры диоскореи дельтовидной, содержащего протодиосцин и дельтозид общей формулы



где R для протодиосцина равно одной молекуле глюкозы и двум молекулам рамнозы, а для дельтозида - двум молекулам глюкозы и одной рамнозы, в качестве иммуномодулирующего средства.

Влияние препарата олигофуростанозидов на бласттрансформацию лимфоцитов, индуцированную ФГА

| Условие опыта   | Доза в мкг/мл | Включение $^3\text{H}$ -тимидина имп/мин | Индекс стимуляции | Примечание             |
|---|---------------|--|-------------------|------------------------|
| Контроль спонтанный без ФГА МНК=2,5x10 <sup>5</sup>             |               | 505 (253-910)                            |                   |                        |
| Контроль стимулированный ФГА (5 мкг/мл) МНК=2,5x10 <sup>5</sup> |               | 5716 (3700-8569)                         | 11                |                        |
| Олигофуростанозид   | 0,01          | 9311 ± 870                               | 18                | Стимуляция             |
| МНК=2,5x10 <sup>5</sup>   | 0,10          | 6496 ± 631                               | 13                | Стимуляция/нет эффекта |
| + препарат + ФГА 5  | 1,00          | 3225 ± 311                               | 7                 | Супрессия              |
| мкг/мл  | 10,0          | 3268 ± 330                               | 7                 | Супрессия              |
|   | 100,0         | 677 ± 64                                 | 0,1               | Полная супрессия       |
| Циклоспорин А   | 0,01          | 3273 ± 323                               | 7                 | Супрессия              |
| МНК=2,5x10 <sup>5</sup> +                                       | 0,10          | 1804 ± 178                               | 3,5               | Супрессия              |
| препарат + ФГА  | 1,00          | 860 ± 84                                 | 1,5               | Супрессия              |
| 5 мкг/мл  | 10,0          | 488 ± 45                                 | 1,0               | Полная супрессия       |
|   | 100,0         | 250 ± 23                                 | 0,5               | Полная супрессия       |

15

Таблица 2

Влияние препарата олигофуростанозидов на активность спонтанных (естественных) киллеров

| Условия опыта                        | Доза в мкг/мл | Влияние препарата на клетки-мишени % лизиса | Литическая активность спонтанных киллеров % лизиса клеток-мишеней |
|--------------------------------------|---------------|---|---|
| Контроль                             |               | 31 ± 3                                      |   |
| Спонтанный лизис клеток-мишеней K562 |               |   |   |
| Контроль                             |               |   | 55 ± 4  |
| Клетки-мишени K562+лимфоциты донора  |               |   |   |
| Препарат олигофуростанозидов         | 0,10          | 33 ± 2                                      | 50 ± 4  |
|                                      | 1,00          | 30 ± 2                                      | 52 ± 5  |
|                                      | 10,00         | 32 ± 3                                      | 51 ± 5  |
| Циклоспорин А                        | 0,10          | 36 ± 4                                      | 51 ± 4  |
|                                      | 1,00          | 31 ± 3                                      | 53 ± 4  |
|                                      | 10,00         | 31 ± 4                                      | 53 ± 5  |

RU 2027434 C1

RU 2027434 C1

Таблица 3

Влияние препарата олигофуростанозидов на Т-супрессорный эффект, индуцированный Кон-А

| Серия опыты | Условия инкубации  | Дозы препара-<br>та, мкг/мл | Включено <sup>3</sup> H-тимидина |   |
|-------------|--|-----------------------------|----------------------------------|---|
|             |  |                             | имп/мин                          | %   |
| 1           | 0,5x10 <sup>6</sup> МНК-72 ч при 37°C-тест-клетки  | -                           | 560 ±40                          | Спонтанный уровень~5%                       |
| 2           | 0,5x10 <sup>6</sup> МНК+ФГА-72 ч при 37°C-тест-система                                       | -                           | 12251± 105                       | 100%  |
| 3           | 0,5x10 <sup>6</sup> МНК+ФГА-48 ч при 37°C-контроль 1   | -                           | 9750± 90                         | 80%   |
| 4           | 0,5x10 <sup>6</sup> МНК+ФГА+ Кон-А-Т-супрессоры-48 ч при 37°C-контроль 2                     | -                           | 2516 ±21                         | 20%   |
| 5           | 0,5x10 <sup>6</sup> МНК+ФГА+<br>+Кон-А-Т-супрессоры+<br>+олигофуростанозид-<br>48 ч при 37°C | 0,10                        | 884 ±7                           | Близко к спон-<br>танному уров-<br>ню 5-10% |
|             |  | 1,0                         | 1104 ±10                         |   |
|             |  | 10,0                        | 755 ±7                           |   |
|             |  | 100,0                       | 766± 8                           |   |
| 6           | 0,5x10 <sup>6</sup> МНК+ФГА+<br>+Кон-А-Т-супрессо-<br>ры+циклоспорин А- 48 ч<br>при 37°C     | 0,1                         | 2722± 25                         | 20%   |
|             |  | 1,0                         | 2786 ±27                         |   |
|             |  | 10,0                        | 2231± 20                         |   |
|             |  | 100,0                       | 1323 ±12                         |   |

Таблица 4

Влияние препарата олигофуростанозидов на формирование РГЗТ у мышей

| Препарат                               | Доза, мг/кг<br>веса тела | Разница массы опытной и контрольной лапок, мг |                        |                      |                        |
|--|--------------------------|---|------------------------|----------------------|------------------------|
|  |                          | Схема-2,-1,0<br>дни                           | Р                      | Схема-0,+1,+2<br>дни | Р                      |
| Контроль                               | -                        | 34,0± 2,5                                     | -                      | 35,0 ±1,7            | -                      |
| Препарат оли-<br>гофуростано-<br>зидов | 100                      | 31,0± 1,2                                     | P <sub>1-2</sub> <0,05 | 21,5± 2,0            | P <sub>1-2</sub> <0,05 |
| Циклоспорин                            | 50                       | 33,5± 2,3                                     | P <sub>1-3</sub> >0,05 | 32,0 ±1,9            | P <sub>1-3</sub> >0,05 |
| Левамизол                              | 25                       | 26,5± 1,9                                     | P <sub>1-4</sub> <0,05 | 26,5± 1,9            | P <sub>1-4</sub> <0,05 |
| 6-меркаптопу-<br>рин                   | 100                      | 34,0± 1,7                                     | P <sub>1-5</sub> >0,05 | 31,0± 1,3            | P <sub>1-5</sub> >0,05 |